

PCT/JP99/02121

日 本 国 特 許 庁 09/673884

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

21.04.99.

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

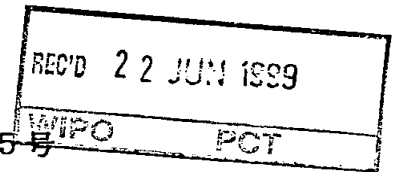
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1998年 4月23日

出 願 番 号  
Application Number:

平成10年特許願第114005号



出 願 人  
Applicant(s):

寶酒造株式会社

5

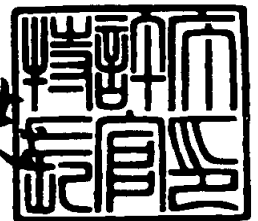
**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 6月 4日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3035327

【書類名】 特許願

【整理番号】 TS-10-003

【提出日】 平成10年 4月23日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 9/00

【発明の名称】 DNAの合成方法

【請求項の数】 20

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内

【氏名】 上森 隆司

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内

【氏名】 佐藤 好美

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内

【氏名】 藤田 朋子

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内

【氏名】 三宅 一恵

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内

【氏名】 向井 博之

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中

央研究所内

【氏名】 浅田 起代蔵

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中  
央研究所内

【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】

【識別番号】 591038141

【氏名又は名称】 寶酒造株式会社

【代理人】

【識別番号】 100095832

【弁理士】

【氏名又は名称】 細田 芳徳

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 050739

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 受託証の写し 2

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 DNAの合成方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 酸性高分子物質を含有してなるDNAポリメラーゼ活性促進剤。

【請求項2】 酸性高分子物質が酸性多糖である請求項1記載のDNAポリメラーゼ活性促進剤。

【請求項3】 酸性多糖が硫酸基を含有するものである請求項2記載のDNAポリメラーゼ活性促進剤。

【請求項4】 酸性高分子物質が、フコース硫酸含有多糖、デキストラン硫酸、カラギーナン、ヘパリン、ラムナン硫酸、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、アルギン酸およびDNAからなる群より選択された1種以上である請求項1～3いずれか記載のDNAポリメラーゼ活性促進剤。

【請求項5】 フコース硫酸含有多糖がフコース硫酸含有多糖-Fである請求項4記載のDNAポリメラーゼ活性促進剤。

【請求項6】 DNA合成反応を行なうに際し、請求項1～5いずれか記載のDNAポリメラーゼ活性促進剤の存在下に反応を行なうことを特徴とするDNA合成方法。

【請求項7】 2種以上のDNAポリメラーゼを使用する請求項6記載のDNA合成方法。

【請求項8】 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを使用する請求項7記載のDNA合成方法。

【請求項9】 α型のDNAポリメラーゼと、非α型非ボルI型のDNAポリメラーゼとを使用する請求項8記載のDNA合成方法。

【請求項10】 ポリメラーゼ チェーン リアクション (PCR) 法により行なう請求項6～9いずれか記載のDNA合成方法。

【請求項11】 請求項1～5いずれか記載のDNAポリメラーゼ活性促進剤を含有してなるDNA合成反応用組成物。

【請求項12】 DNAポリメラーゼを含有してなる請求項11記載のDNA

A 合成反応用組成物。

【請求項 13】 2 種以上の DNA ポリメラーゼを含有してなる請求項 12 記載の DNA 合成反応用組成物。

【請求項 14】 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する 2 種以上の DNA ポリメラーゼを含有してなる請求項 13 記載の DNA 合成反応用組成物。

【請求項 15】 α 型の DNA ポリメラーゼと、非 α 型非ボル I 型の DNA ポリメラーゼとを含有してなる請求項 14 記載の DNA 合成反応用組成物。

【請求項 16】 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する 2 種以上の DNA ポリメラーゼを含有してなる DNA 合成反応用組成物。

【請求項 17】 α 型の DNA ポリメラーゼと、非 α 型非ボル I 型の DNA ポリメラーゼとを含有してなる請求項 16 記載の DNA 合成反応用組成物。

【請求項 18】 DNA 合成反応を行なうに際し、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する 2 種以上の DNA ポリメラーゼを使用することを特徴とする DNA 合成方法。

【請求項 19】 α 型の DNA ポリメラーゼと、非 α 型非ボル I 型の DNA ポリメラーゼとを使用する請求項 18 記載の DNA 合成方法。

【請求項 20】 ポリメラーゼ チェーン リアクション (PCR) 法により行なう請求項 18 又は 19 記載の DNA 合成方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は遺伝子工学分野において有用な DNA の合成方法、ならびに該方法に使用される組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】

遺伝子工学分野の研究において DNA の合成は種々の目的に使用される。このうちオリゴヌクレオチドのような短鎖の DNA の合成を除けば、そのほとんどは DNA ポリメラーゼを利用した酵素的方法により実施されている。したがって DNA 塩基配列決定、DNA の標識、部位特異的変異導入のための試薬として、D

NAポリメラーゼは高い価値を有している。また最近ではポリメラーゼ チェーン リアクション (PCR) 法の開発により、耐熱性DNAポリメラーゼが注目を集め、PCR法に適した種々のDNAポリメラーゼが開発され、商品化されている。

## 【0003】

現在知られているDNAポリメラーゼはそのアミノ酸配列の共通性から大きく4つのファミリーに分類することができ、中でもファミリーA (ポルI型酵素) とファミリーB ( $\alpha$ 型酵素) が大多数を占めている。それぞれのファミリーに属するDNAポリメラーゼは概ね類似した生化学的特性を有しているが、詳細に比較すると個々の酵素によって基質特異性、基質アナログの取込み効率、プライマー伸長性の強さ及び速度、DNA合成の様式、エキソヌクレアーゼ活性の付随、温度、pHなどの至適反応条件、また阻害剤に対する感受性などについて異なる性質を有している。したがって、これまでは入手可能なDNAポリメラーゼの中から用途に最も適した性質を有するものを選んで使用されてきた。

## 【0004】

超好熱性古細菌であるピロコッカス フリオサス (*Pyrococcus furiosus*) は $\alpha$ 型に属するDNAポリメラーゼを生産しており、すでにその遺伝子も単離されている [ヌクレイック アシズ リサーチ (Nucleic Acids Research) 第21巻、259~265頁 (1993)]。最近、これまでに知られているDNAポリメラーゼとはまったく構造的な類似のない新規のDNAポリメラーゼが該菌株から発見された。このDNAポリメラーゼは2種の新規タンパク質が複合体を形成してDNAポリメラーゼ活性を発現する。また、該酵素は強い3'  $\rightarrow$  5' エキソヌクレアーゼ活性と優れたプライマー伸長活性とを示し、たとえば該酵素をPCRに用いた場合には20kbもの長さのDNA断片を増幅することが可能である。

## 【0005】

一方、DNAポリメラーゼを用いたDNA合成反応では、使用する酵素の選択と同様にその反応条件を適切なものに設定することが重要である。反応条件の主なものとしては反応液の組成、pH、反応温度などがあり、これらの条件を使用する酵素や目的に応じて設定しなければならない。しかしながらこのような設定

が困難な場合もある。例えば、クレノウ・フラグメント (Klenow fragment) を使用したDNA合成反応では、鋳型DNAに対して過剰量に存在する酵素が鋳型DNAとアグリゲーションを起し、合成反応の効率を低下させることが知られているが、このような現象には添加酵素量の調節以外に適当な解決策は知られていない。

#### 【0006】

また、複数のDNAポリメラーゼを組み合わせることによって単独のDNAポリメラーゼでは不可能であった効率のよいDNA合成が可能となることが知られている [プロシーディングズ オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシーズ オブ ザ USA (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第91巻、第5695～5699頁 (1994)]。該方法は、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼ (例えば上記のピロコッカス フリオサス由来α型DNAポリメラーゼ) と該活性を有していないDNAポリメラーゼ [例えばサーマス アクアティカス (Thermus aquaticus) 由来のDNAポリメラーゼ (Taq polymerase)] とを混合してPCRに使用するというものであり、LA-PCR法として知られている。この方法により、従来行われてきた1種のDNAポリメラーゼのみを使用するPCRに比べて増幅されるDNAの収量が増加する。また、従来のPCRでは増幅できなかった長鎖長のDNAを増幅することも可能となる。ただし、このような効果は上記のように3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素と有さない酵素との組み合わせに限って発揮される。

#### 【0007】

上記のようにDNAポリメラーゼを用いたDNA合成反応は遺伝子工学的実験手法として必要不可欠なものであり、その効率を向上させることは研究全体を効率よく行なう上でも重要である。しかしながら現在使用されている反応系は至適化されたものとは言えない。このため、これまでのDNA合成反応に比べて優れた効率でDNA合成を実施することが可能な方法が求められている。

#### 【0008】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は前記従来技術に鑑みてなされたものであり、本発明の目的は、DNA

ポリメラーゼ活性促進剤、該DNAポリメラーゼ活性促進剤の存在下に反応を行なうことを特徴とするDNA合成方法、該DNA合成方法に用いるためのDNA合成反应用組成物、前記DNAポリメラーゼ活性促進剤を含有したDNA合成反应用組成物、DNA合成反応を行なうに際し、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを使用することを特徴とするDNA合成方法を提供することにある。

【0009】

【発明を解決するための手段】

本発明者らは鋭意研究の結果、酸性高分子物質の共存下においてDNAポリメラーゼによるDNA合成反応の効率が向上することを見出した。また、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを混合した場合に極めて効率のよいDNA合成が起こることを見出した。さらに、これらの技術を組み合わせることにより、優れた遺伝子増幅反応系を構築し、本発明を完成するに至った。

【0010】

即ち、本発明の要旨は、以下に示すとおりである。

- 〔1〕 酸性高分子物質を含有してなるDNAポリメラーゼ活性促進剤、
- 〔2〕 酸性高分子物質が酸性多糖である前記〔1〕記載のDNAポリメラーゼ活性促進剤、
- 〔3〕 酸性多糖が硫酸基を含有するものである前記〔2〕記載のDNAポリメラーゼ活性促進剤、
- 〔4〕 酸性高分子物質が、フコース硫酸含有多糖、デキストラン硫酸、カラギーナン、ヘパリン、ラムナン硫酸、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、アルギン酸およびDNAからなる群より選択された1種以上である前記〔1〕～〔3〕いずれか記載のDNAポリメラーゼ活性促進剤、
- 〔5〕 フコース硫酸含有多糖がフコース硫酸含有多糖-Fである前記〔4〕記載のDNAポリメラーゼ活性促進剤、
- 〔6〕 DNA合成反応を行なうに際し、前記〔1〕～〔5〕いずれか記載のDNAポリメラーゼ活性促進剤の存在下に反応を行なうことを特徴とするDNA合



成方法、

〔7〕 2種以上のDNAポリメラーゼを使用する前記〔6〕記載のDNA合成方法、

〔8〕 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを使用する前記〔7〕記載のDNA合成方法、

〔9〕 α型のDNAポリメラーゼと、非α型非ボルI型のDNAポリメラーゼとを使用する前記〔8〕記載のDNA合成方法、

〔10〕 ポリメラーゼ チェーン リアクション (PCR) 法により行なう前記〔6〕～〔9〕いずれか記載のDNA合成方法、

〔11〕 前記〔1〕～〔5〕いずれか記載のDNAポリメラーゼ活性促進剤を含有してなるDNA合成反応用組成物、

〔12〕 DNAポリメラーゼを含有してなる前記〔11〕記載のDNA合成反応用組成物、

〔13〕 2種以上のDNAポリメラーゼを含有してなる前記〔12〕記載のDNA合成反応用組成物、

〔14〕 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを含有してなる前記〔13〕記載のDNA合成反応用組成物、

〔15〕 α型のDNAポリメラーゼと、非α型非ボルI型のDNAポリメラーゼとを含有してなる前記〔14〕記載のDNA合成反応用組成物、

〔16〕 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを含有してなるDNA合成反応用組成物、

〔17〕 α型のDNAポリメラーゼと、非α型非ボルI型のDNAポリメラーゼとを含有してなる前記〔16〕記載のDNA合成反応用組成物、

〔18〕 DNA合成反応を行なうに際し、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを使用することを特徴とするDNA合成方法、

〔19〕 α型のDNAポリメラーゼと、非α型非ボルI型のDNAポリメラーゼとを使用する前記〔18〕記載のDNA合成方法、

〔20〕 ポリメラーゼ チェーン リアクション (PCR) 法により行なう前

記〔18〕又は〔19〕記載のDNA合成方法、  
に関する。

【0011】

【発明の実施の形態】

(1) 本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤

本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤はDNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を促進する作用を有するものであり、電荷的に負の電荷を有する物質、なかでも酸性の高分子物質を含有することを1つの大きな特徴とする。

【0012】

このDNA合成活性を促進する作用は、通常のDNAポリメラーゼ活性測定、たとえば新規合成DNA鎖への標識ヌクレオチド取り込み活性の測定を行う際に該物質を添加し、添加しない場合の活性と比較することによって調べることができる。また、DNA合成活性を促進する作用は、単位時間当たりの新規合成DNA鎖の鎖長やPCRにおける増幅産物量によって調べることができる。

【0013】

DNA合成活性を促進する作用を有する酸性高分子物質としては、特に限定されるものではないが、例えばDNAや酸性多糖のような酸性高分子物質を使用することができる。本発明に使用することができる酸性多糖としては、たとえばフコース硫酸含有多糖、デキストラン硫酸、カラギーナン、ヘパリン、ラムナン硫酸、コンドロイチン硫酸等の硫酸化多糖、ヒアルロン酸、アルギン酸等のポリウロン酸等が包含される。また、フコース硫酸含有多糖としては、たとえばフコース硫酸含有多糖-Fを使用することができる。ここで、フコース硫酸含有多糖-Fとは、例えばWO97/26896号国際公開公報に記載の方法により、褐藻植物などより得られる、ウロン酸を実質的に含まないフコース硫酸含有多糖をいう。

【0014】

前記酸性高分子物質は、例えば、DNA合成活性を促進する作用を保持している物質であれば、天然物から単離精製されたものであってもよく、前記酸性高分子物質を含有する未精製物、部分精製物であってもよい。さらに、DNA合成活

性を促進する作用を保持している範囲で適当な修飾を施されていてもよい。また、分子量が適当なものとなるような分解操作を施したり、その後に分子量分画を行なったものであっても、DNA合成活性を促進する作用を有する物質であれば、使用することができる。さらに、これらの物質は単独で、または混合して使用することができる。

## 【0015】

本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤がその活性を促進するDNAポリメラーゼには特に限定はなく、たとえばポリI型DNAポリメラーゼ（大腸菌DNAポリメラーゼI、クレノウ・フラグメント等）、 $\alpha$ 型DNAポリメラーゼ〔上記のピロコッカス フリオサス由来 $\alpha$ 型DNAポリメラーゼ、サーモコッカス リトラリス（*Thermococcus litralis*）由来DNAポリメラーゼ（Vent DNA polymerase）等〕、これらのどちらにも属さない非 $\alpha$ 非ポリI型DNAポリメラーゼが挙げられる。なお、ポリI型DNAポリメラーゼ、 $\alpha$ 型DNAポリメラーゼはともにそのアミノ酸配列上の相同性から分類される一群の酵素を指し、そのアミノ酸配列上の特徴はヌクレイック アシッズ リサーチ、第15巻、4045～4057頁（1991）に記載されている。

## 【0016】

また、非 $\alpha$ 非ポリI型DNAポリメラーゼとしては、例えばWO97/24444号国際公開公報に記載のピロコッカス フリオサス由来DNAポリメラーゼが挙げられる。なお、本明細書においては、同じくピロコッカス フリオサスの生産する $\alpha$ 型DNAポリメラーゼと区別するため、前記ピロコッカス フリオサス由来の非 $\alpha$ 非ポリI型DNAポリメラーゼをPfu DNAポリメラーゼIIと記載する。また、前記ピロコッカス フリオサス由来の $\alpha$ 型DNAポリメラーゼはPfu DNAポリメラーゼIと記載する。

## 【0017】

Pfu DNAポリメラーゼIIは、以下に示すような性質を有する酵素である。

Pfu DNAポリメラーゼIIの性質：

- ① 一本鎖の鋳型DNAにプライマーがアニーリングした複合体を基質としてポ

リメラーゼ活性を測定した場合に、活性化DNAを基質とした場合に比べて高い活性を示す。

② 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

③ λ-DNAを鋳型としたポリメラーゼ チェーン リアクション (PCR) を以下の条件で行った場合、他の酵素の添加なしに約20キロ塩基対のDNA断片を増幅することが可能である；

PCRの条件：

(a) 反応液組成：10 mM トリスー塩酸 (pH 9.2)、3.5 mM MgCl<sub>2</sub>、75 mM KCl、400 μM dATP, dCTP, dGTP, dTTP、0.01% ウシ血清アルブミン、0.1% トリトンX-100、5.0 ng/50 μl λ-DNA、10 pmole/50 μl プライマーλA (配列表の配列番号：1)、およびプライマーλB (配列表の配列番号：2)、3.7 単位/50 μl DNAポリメラーゼを含む；

(b) 反応条件：98℃、10秒～68℃、10分を1サイクルとした30サイクルのPCRを行う。

④ SDS-PAGE上で約90,000ダルトン、約140,000ダルトンに相当する2種のDNAポリメラーゼ構成タンパク質よりなる。

#### 【0018】

また、前記Pfu DNAポリメラーゼIIをコードする遺伝子はすでにクローニングされており、該遺伝子を含むプラスミドpFU1001で形質転換された大腸菌JM109は *Escherichia coli* JM109 /pFU1001 と命名、表示され、平成7年8月11日 (原寄託日) より通産省工業技術院生命工学工業技術研究所 (あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号：305-0046)) に受託番号：FERM BP-5579として寄託されている。したがって、該形質転換体を培養し、得られた培養物より、例えば、WO97/24444号国際公開公報 (28～29頁、実施例3) に記載の方法により、前記Pfu DNAポリメラーゼIIを取得することができる。

#### 【0019】

上記のような各種のDNAポリメラーゼを使用するDNA合成反応において、

その反応液中に本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤を添加することにより、驚くべく該DNAポリメラーゼによるDNA合成の効率が向上する。

#### 【0020】

例えば、本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤を添加した反応液を用いてPCRを行なった場合、添加されていない場合に比較して増幅産物の量が増加する。また、少量の鋳型DNAからも効率よいDNAの増幅が可能である。さらに、同じ量の増幅産物を得るために要する反応時間が従来のPCRに比べて短縮される。一般にPCRでは二本鎖鋳型DNAの一本鎖への解離（変性）、一本鎖鋳型DNAへのプライマーのアニールリング、プライマーからの相補鎖合成（伸長）の3つのステップによりDNAの増幅が実施される。本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤は、特に上記の伸長のステップに要する時間を短縮することができ、したがって増幅反応全体に要する時間を短縮することができる。本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤の反応液への添加量は、所望のDNAポリメラーゼ活性促進作用を指標に適宜決定することができる。

#### 【0021】

本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤は、増幅反応全体に要する時間を短縮できるため、例えば、PCR法に基づく遺伝子診断法等に使用することによって、より短時間で遺伝子診断法等を行なうことができるという優れた効果を発揮する。

#### 【0022】

##### （2）本発明のDNA合成反応用組成物

本発明のDNA合成反応用組成物としては、たとえば上記の（1）に示されたDNAポリメラーゼ活性促進剤を含有するものが挙げられる。該組成物はDNAポリメラーゼを用いたDNA合成に必要な各種成分、例えばdNTP、MgCl<sub>2</sub>や適正なpHを保つための緩衝成分を含んでいてもよい。さらにDNAポリメラーゼを含んでいてもよい。

#### 【0023】

DNA合成反応用組成物に含有されるDNAポリメラーゼには特に限定はなく、上記の（1）に示された各種のDNAポリメラーゼが挙げられる。DNAポリ

メラーゼは1種の酵素のみが含まれていてもよく、複数種の酵素が含まれていてもよい。例えば、複数種のDNAポリメラーゼを含有する場合、上記のLA-PCRに使用される3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼと有さないDNAポリメラーゼの組み合わせであってもよい。また、耐熱性のDNAポリメラーゼが含有された本発明のDNA合成反応用組成物は、高次構造を形成しやすい塩基配列を有するDNAの合成やPCRへの使用に適している。

## 【0024】

また、本発明のDNA合成反応用組成物の別の態様として、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを含有する組成物が挙げられる。該組成物も上記のようなDNA合成に必要な各種成分および／または上記のDNAポリメラーゼ活性促進剤を含有するものであってもよい。

## 【0025】

複数のDNAポリメラーゼを含有する組成物としては、従来、LA-PCR法に利用される組成物が知られていた。上記のように、LA-PCR法に利用される組成物は3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼと該活性を有しないDNAポリメラーゼとを組み合わせで調製されている。本発明者らは、驚くべきことに3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼどうしを組み合わせた場合にはLA-PCR法よりも合成効率に優れたDNA合成反応が達成されることを明らかにした。このような組成物としては、特に限定するものではないが、例えばα型に属する耐熱性DNAポリメラーゼと非α非ボルI型に属する耐熱性DNAポリメラーゼとを組み合わせた組成物を挙げることができる。また、上記のDNAポリメラーゼ活性促進剤を添加することにより、該組成物の性能はさらに向上する。

## 【0026】

該組成物の有する特徴のひとつは単位時間当たりのDNA合成速度が非常に高いことにある。該組成物をPCR法に使用した場合、同一鎖長のDNAの増幅に要する時間は従来のPCR法、LA-PCR法に比べて短い。したがって従来法ではDNAの増幅が不可能であったPCR条件においてもDNAの増幅が可能である。

## 【0027】

本発明のDNA合成反応用組成物は、増幅反応全体に要する時間を短縮できるため、例えば、PCR法に基づく遺伝子診断法等に使用することによって、より短時間で遺伝子診断法等を行なうことができるという優れた効果を発揮する。

## 【0028】

## (3) 本発明のDNA合成方法

本発明のDNAポリメラーゼ活性促進剤、あるいは本発明のDNA合成反応用組成物を使用して反応液を調製することにより、従来よりも高い効率でDNA合成反応を行なうことができる。例えば、本発明のDNA合成方法をPCR法に利用した場合には、従来のPCR法、又はLA-PCR法よりも短時間の反応で増幅産物を得ることができる。

## 【0029】

したがって、本発明のDNA合成方法によれば、増幅反応全体に要する時間を短縮できるため、例えば、PCR法に基づく遺伝子診断法等に使用することによって、より短時間で遺伝子診断法等を行なうことができるという優れた効果を発揮する。

## 【0030】

また、DNAの標識、ジデオキシ法による塩基配列の決定等のDNAポリメラーゼを利用した操作にも本発明のDNA合成方法を利用することが可能である。

## 【0031】

## 【実施例】

以下に実施例をもってさらに詳細に本発明を説明するが、本発明は実施例の範囲に限定されるものではない。

## 【0032】

下記実施例において、市販の酵素の活性は各酵素の表示に基づいて示した。また、市販の酵素を含む反応液の調製は、特に断らない限り各酵素の説明書にしたがうか、あるいは添付されている反応用緩衝液を使用して調製した。PCRはジーンアンプ PCRシステム9600 (GeneAmp PCR System 9600、パーキナーエルマー社製) を使用して実施した。

【0033】

実施例1 Pfu DNAポリメラーゼ II の調製

Pfu DNAポリメラーゼ II をコードする遺伝子を含有するプラスミド pFU1001 で形質転換された大腸菌 JM109、 *Escherichia coli* JM109 / pFU1001 (FERM PB-5579) を培養して得られる菌体より Pfu DNAポリメラーゼ II を精製し、以下の操作に使用した。なお、形質転換体の培養、酵素の精製は WO97/24444 号国際公開公報 (28~29 頁、実施例 3) に記載の方法にしたがって行なった。

【0034】

なお、上記の Pfu DNAポリメラーゼ II の酵素活性は以下の方法で測定した。基質には仔牛胸腺 DNA (ワージントン社製) を活性化したもの (活性化 DNA) を用いた。DNA の活性化および DNAポリメラーゼ活性の測定は、ハーバー アンド ロー社発行、D. R. デービス (D. R. Davis) 編集の DNAポリメラーゼ フロム エシェリヒア コリ (DNA polymerase from *Escherichia coli*) 第 263 ~ 276 頁 (C. C. リチャードソン著) に記載の方法で行った。活性を測定しようとする試料 5  $\mu$ l に反応液 [20 mM トリス-塩酸 (pH 7.7)、15 mM  $MgCl_2$ 、2 mM 2-メルカプトエタノール、0.2 mg / ml 活性化 DNA、40  $\mu$ M dATP、dCTP、dGTP、dTTP、60 nM [ $^3H$ ] dTTP (アマシャム社製)] 45  $\mu$ l を添加し、75℃で 5 分間反応させた。そのうちの 40  $\mu$ l を DE ペーパー (ワットマン社製) にスポットし、5 重量%  $Na_2HPO_4$  で洗浄を 5 回行った後に DE ペーパー上に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。上記の酵素活性測定方法によって 30 分間あたりに 10 nmol の [ $^3H$ ] dTMP を基質 DNA に取り込む酵素量を酵素 1 単位とした。

【0035】

実施例2 プライマーの作製

$\lambda$ -DNA の塩基配列をもとに  $\lambda$ 1 ~  $\lambda$ 5、 $\lambda$ 8 ~  $\lambda$ 10 の 8 種類のプライマーを合成した。プライマー  $\lambda$ 1 ~  $\lambda$ 5、 $\lambda$ 8 ~  $\lambda$ 10 の塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号：3 ~ 10 に示す。これらのプライマーの組み合わせによって  $\lambda$ -



DNAを鋳型としたPCRで増幅される増幅DNA断片の鎖長を表1に示す。

【0036】

【表1】

プライマー対	増幅DNA断片の鎖長
$\lambda 1 \quad / \quad \lambda 2$	0.5kb
$\lambda 1 \quad / \quad \lambda 3$	1kb
$\lambda 1 \quad / \quad \lambda 4$	2kb
$\lambda 1 \quad / \quad \lambda 5$	4kb
$\lambda 1 \quad / \quad \lambda 8$	10kb
$\lambda 1 \quad / \quad \lambda 9$	12kb
$\lambda 1 \quad / \quad \lambda 10$	15kb

【0037】

### 実施例3 フコース硫酸含有多糖-Fの調製

フコース硫酸含有多糖-Fは、ガゴメ昆布を原料とし、WO97/26896 国際公開公報に記載のフラボバクテリウム sp. SA-0082 [Flavobacterium sp. SA-0082と命名・表示され、平成7年3月29日（原寄託日）より通産省工業技術院生命工学工業技術研究所（あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号：305-0046））に受託番号：FERM BP-5402として寄託されている] 由来のエンド型フコイダン分解酵素を使用する方法にしたがって精製した。以下の実施例において使用されたフコース硫酸含有多糖-Fはすべて該方法で精製されたものである。以下にフコース硫酸含有多糖-Fの調製例を示す。

【0038】

(1) ガゴメ昆布を充分乾燥後、2kgを粉砕し、得られた乾燥粉末を9リットルの80%エタノールに懸濁し80℃、2時間処理した。処理後ろ紙によりろ過し残渣を得た。この残渣に対して上記エタノール洗浄、ろ過という操作を3回繰

り返しエタノール洗浄残渣を得た。この残渣を36リットルの0.2M酢酸カルシウム溶液に懸濁後、95℃、2時間処理し、ろ過した。残渣を4リットルの0.2M酢酸カルシウム溶液で洗浄し、ガゴメ昆布のフコース硫酸含有多糖抽出液36リットルを得た。得られたろ液に5%の塩化セチルピリジニウムをそれ以上沈殿が生じなくなるまで添加し遠心分離により沈殿を集めた。この沈殿を3リットルの0.4M塩化ナトリウム溶液に懸濁後遠心分離し、洗浄した。この洗浄操作を3回繰り返した後沈殿に1リットルの4M塩化ナトリウム溶液を添加しよくかくはん後エタノールを80%となるように添加し、かくはん後遠心分離により沈殿を得た。この沈殿を80%エタノール中に懸濁し遠心分離するという操作を、上清中の260nmの吸光度を0になるまで繰り返した。この沈殿を2Mの塩化ナトリウム溶液3リットルに溶解し、不溶物を遠心分離により除去後、2Mの塩化ナトリウム溶液で平衡化した100mlのDEAE-セルロファインA-800（生化学工業社製）を添加し、かくはん後、加えた樹脂をろ過により除去した。ろ液を2Mの塩化ナトリウム溶液で平衡化したDEAE-セルロファインA-800カラムにかけ、非吸着画分を排除分子量10万以下のホロファイバーを備えた限外ろ過装置で限外ろ過し、着色性物質及び塩化ナトリウムを完全に除去後、遠心分離及びろ過により不溶性物質を除去し、凍結乾燥し、フコース硫酸含有多糖を得た。凍結乾燥フコース硫酸含有多糖の重量は90gであった。

【0039】

(2) フラボバクテリウム s p. SA-0082 (FERM BP-5402) をグルコース0.25%、ペプトン1.0%、酵母エキス0.05%を含む人工海水（ジャマリンラボラトリー製）pH7.5からなる培地600mlを分注して殺菌した（120℃、20分）2リットルの三角フラスコに接種し、24℃で24時間培養して種培養液とした。グルコース0.25%、ペプトン1.0%、酵母エキス0.05%、及び消泡剤（信越化学工業製KM70）0.01%を含む人工海水（ジャマリンラボラトリー製）pH7.5からなる培地20リットルを30リットル容のジャーファーマンターに入れ120℃で20分殺菌した。冷却後、上記の種培養液600mlを接種し、24℃で24時間、毎分10リットルの通気量と毎分125回転のかくはん速度の条件で培養した。培養終了後、培

養液を遠心分離して菌体を得た。

【0040】

この菌体を、200 mMの塩化ナトリウムを含む20 mMの酢酸－リン酸緩衝液（pH 7.5）に懸濁し、超音波破碎後、遠心分離して菌体抽出液を得た。この菌体抽出液中の本エンド型フコイダン分解酵素の活性を測定したところ、培地1 ml中に5 mUの活性が検出された。

【0041】

本抽出液に、終濃度が90%飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、かくはん溶解後遠心分離し、沈殿を上記菌体抽出液と同じ緩衝液に懸濁して、50 mMの塩化ナトリウムを含む20 mMの酢酸－リン酸緩衝液（pH 7.5）で充分透析した。透析により生じた沈殿を遠心分離により除去後、あらかじめ50 mMの塩化ナトリウムを含む20 mMの酢酸－リン酸緩衝液（pH 7.5）で平衡化したDEAE－セファロースFF（ファルマシア社製）のカラムに吸着させ、吸着物を同緩衝液にて充分洗浄後、50 mMから600 mMの塩化ナトリウムのグラジエントにより溶出させ、活性画分を集めた。次にこの活性画分に終濃度が4 Mとなるように塩化ナトリウムを加え、あらかじめ4 Mの塩化ナトリウムを含む20 mMのリン酸緩衝液（pH 8.0）で平衡化したフェニルセファロースCL-4B（ファルマシア社製）のカラムに吸着させ、吸着物を同緩衝液で充分洗浄後、4 Mから1 Mの塩化ナトリウムのグラジエントにより溶出させ、活性画分を集めた。次にこの活性画分を限外ろ過器で濃縮後、あらかじめ50 mM塩化ナトリウムを含む10 mMリン酸緩衝液で平衡化したセファクリル S-300（ファルマシア社製）でゲルろ過を行い活性画分を集めた。この酵素の分子量をセファクリル S-300の保持時間から求めたところ約46万であった。次にこの活性画分を250 mMの塩化ナトリウムを含む10 mMのリン酸緩衝液（pH 7）で透析した。この酵素液を、あらかじめ250 mMの塩化ナトリウムを含む10 mMのリン酸緩衝液（pH 7）で平衡化したモノ（Mono）Q HR 5/5（ファルマシア社製）のカラムに吸着させ、吸着物を同緩衝液で充分洗浄後、250 mMから450 mMの塩化ナトリウムのグラジエントにより溶出させ、活性画分を集め、精製酵素を得た。

【0042】

本酵素の活性測定は下記の様に行う。上記の凍結乾燥フコース硫酸含有多糖の 2.5% 溶液 50  $\mu$ l と、10  $\mu$ l の本酵素と、60  $\mu$ l の 667 mM 塩化ナトリウムを含む 83 mM リン酸緩衝液 pH 7.5 を混合し、37℃、3 時間反応させた後、反応液 105  $\mu$ l と水 2 ml を混合、かくはんし、その 230 nm における吸光度 (AT) を測定する。対照として、本酵素の代りに、本酵素を溶解している上記緩衝液のみを用いて同様の条件により反応させたもの、及びフコイダン溶液の代りに水のみを用いて反応を行ったものを用意し、それぞれ同様に吸光度を測定する (AB1 及び AB2)。

【0043】

1 単位の酵素は、上記反応系において 1 分間に 1  $\mu$ mol のマンノースとウロン酸の間のグリコシド結合を脱離的に切断する酵素量とする。切断された結合の定量は、脱離反応の際に生じた不飽和ウロン酸のミリモル分子吸光係数を 5.5 として計算し行う。なお、酵素の活性は下記式により算出する。

【0044】

$$(AT - AB1 - AB2) \times 2.105 \times 120 / 5.5 \times 105 \times 0.01 \times 180 = \text{酵素活性 (U/ml)}$$

【0045】

式中の数値は、下記に示す。

2.105 : 吸光度を測定するサンプルの液量 (ml)

120 : 酵素反応液の液量 ( $\mu$ l)

5.5 : 不飽和ウロン酸の 230 nm におけるミリモル分子吸光係数 (/mM)

105 : 希釈に用いる反応液の液量 ( $\mu$ l)

0.01 : 酵素液量 (ml)

180 : 反応時間 (分)

【0046】

タンパク質の定量は、酵素液の 280 nm の吸光度を測定することにより行う。その際 1 mg/ml のタンパク質溶液の吸光度を 1.0 として計算する。

## 【0047】

(3) 前記実施例3の(1)と同様にして得られた凍結乾燥フコース硫酸含有多糖を10g秤量し、500mlの人工海水に溶解後、前記実施例3の(2)と同様にして得られたフラボバクテリウム *sp.* SA-0082 (FERM BP-5402) 由来のエンド型フコイダン分解酵素を5U添加し、25℃、50時間反応させた。反応液を排除分子量10万以下のホロファイバーを備えた限外ろ過装置で限外ろ過し、低分子性物質を完全に除去後、遠心分離及びろ過により不溶性物質を除去し、フコース硫酸含有多糖-Fを調製した。このフコース硫酸含有多糖-Fを凍結乾燥し、凍結乾燥フコース硫酸含有多糖-Fを6g得た。

## 【0048】

実施例4 酸性高分子によるDNAポリメラーゼ活性の促進

(1) Pfu DNAポリメラーゼ II の活性への影響

酸性高分子物質として上記実施例3と同様にして得られたフコース硫酸含有多糖-F、仔牛胸腺DNA (ワージントン社製)、ヘパリン (和光純薬社製) を使用し、これらがPfu DNAポリメラーゼ II の活性に与える影響を調べた。

## 【0049】

鋳型として $\lambda$ -DNA、プライマー対としてプライマー $\lambda$ 1および $\lambda$ 3、DNAポリメラーゼとしてPfu DNAポリメラーゼ II を含む反応液を調製し、PCRを行った。

## 【0050】

反応液の組成および反応条件を以下に示す：

10mM トリス-塩酸、pH9.2、75mM KCl、6mM MgCl<sub>2</sub>、0.4mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP、0.01% BSA、および1.25単位のPfu DNAポリメラーゼ II、500pgの $\lambda$ -DNA、5pmolずつのプライマー $\lambda$ 1および $\lambda$ 3 (最終容量は25 $\mu$ l)。

## 【0051】

さらに前記反応液中に、それぞれ5ngのフコース硫酸含有多糖-F、200ngの仔牛胸腺DNAまたは0.5ng、1ng、2ng、5ngのヘパリンを添加した。

【0052】

反応は98℃、0秒～68℃、0秒を1サイクルとした25サイクルで行った。なお、本明細書においては、「98℃、0秒」、「68℃、0秒」等の記載は、温度が設定された温度に達したと同時に次の設定温度への移行が起こるように反応装置をプログラムしたことを示す。

【0053】

反応終了後、反応液5 $\mu$ lを1%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。その結果、どの酸性高分子物質を添加した場合でも予想される1kbの断片が良好に増幅されていることが確認された。0.5ngのヘパリンを添加した場合は特に効率良く増幅されていた。一方、酸性高分子物質を添加していない同様の反応液について上記の反応条件でPCRを実施したところ、1kbの増幅断片は確認できなかった。

【0054】

さらに、長鎖長のDNAの増幅について検討をおこなった。鋳型の $\lambda$ -DNA量を2.5ngに、またプライマー対をプライマー $\lambda$ 1および $\lambda$ 5あるいはプライマー $\lambda$ 1および $\lambda$ 10のそれぞれに変更した他は上記と同様のPCR反応液を調製した。なお、酸性高分子物質としては200ngの仔牛胸腺DNAまたは5ngのフコース硫酸含有多糖-Fを添加した。反応は、98℃、0秒～68℃、5分を1サイクルとした30サイクルで行った。その結果、仔牛胸腺DNAまたはフコース硫酸含有多糖-Fを添加した場合には、プライマー $\lambda$ 1および $\lambda$ 5では4kb、またプライマー $\lambda$ 1および $\lambda$ 10では15kbの増幅断片がそれぞれ確認された。一方、これらの酸性高分子物質を添加していないものではどちらのプライマー対でも増幅断片は確認できなかった。

【0055】

(2) Pfu DNAポリメラーゼIの活性への影響

酸性高分子物質であるフコース硫酸含有多糖-FがPfu DNAポリメラーゼIの活性に与える影響を調べた。なお、Pfu DNAポリメラーゼIには組換えDNA技術を利用して調製された酵素(Cloned Pfu DNA Polymerase、ストラタジーン社製)を使用した。

【0056】

鋳型として $\lambda$ -DNA、プライマー対としてプライマー $\lambda$ 1および $\lambda$ 2、DNAポリメラーゼとしてPfu DNAポリメラーゼIを含む反応液を調製し、PCRを行った。

【0057】

反応液の組成を以下に示す：

Pfu DNAポリメラーゼI用緩衝液（ストラタジーン社製）、0.2mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP、1.25単位のPfu DNAポリメラーゼI、500pgの鋳型DNA、5pmolずつのプライマー（最終容量は25 $\mu$ l）。この反応液に20ngのフコース硫酸含有多糖-Fを添加したもの、添加しないものの2種の反応液を調製した。

【0058】

調製した反応液について94℃、30秒～55℃、30秒～72℃、60秒を1サイクルとした25サイクルの反応を行った後、反応液5 $\mu$ lを1%アガロースゲルにて電気泳動して、増幅DNA断片を確認した。増幅された0.5kbのDNA断片の量を比較したところ、フコース硫酸含有多糖-Fを添加した反応液中のDNA増幅量の方が多いことが判明した。このことから、フコース硫酸含有多糖-Fの添加によりPfu DNAポリメラーゼIによるDNA増幅効率が向上することが確認された。

【0059】

実施例5 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する2種のDNAポリメラーゼを使用したPCR

共に3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼであるPfu DNAポリメラーゼIIとPfu DNAポリメラーゼIの両者を同時に使用したPCRについて検討を行なった。なお、Pfu DNAポリメラーゼIには上記のCloned Pfu DNA Polymerase（ストラタジーン社製）を使用した。

【0060】

(1) Pfu DNAポリメラーゼI、Pfu DNAポリメラーゼIIを混合して使用するPCR

鋳型として $\lambda$ -DNA、プライマー対としてプライマー $\lambda$ 1および $\lambda$ 8を含む反応液を調製し、PCRを行った。このPCRにはPfu DNAポリメラーゼI及びPfu DNAポリメラーゼIIの両者を使用した。

【0061】

反応液の組成を以下に示す：

10mMトリスー塩酸、pH9.2、75mM KCl、6mM MgCl<sub>2</sub>、0.4mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP、0.01% BSA、500pgの鋳型DNA、5pmolずつのプライマー $\lambda$ 1および $\lambda$ 8。

【0062】

前記反応液に0.375単位のPfu DNAポリメラーゼIIおよび0.125、0.375、0.75、1.25単位のPfu DNAポリメラーゼIをそれぞれ添加し、反応液の最終容量は25 $\mu$ lとした。また対照として、Pfu DNAポリメラーゼIのみを添加した反応液、Pfu DNAポリメラーゼIIのみを添加した反応液も準備した。

【0063】

これらの反応液について98℃、0秒～68℃、3分を1サイクルとした25サイクルの反応を行った後、反応液5 $\mu$ lを1%アガロースゲルにて電気泳動して、増幅DNA断片を確認した。その結果、Pfu DNAポリメラーゼIのみでは、その添加量にかかわらず10kbのDNA断片の増幅は確認されなかった。またPfu DNAポリメラーゼIIのみではごくわずかな10kb断片が認められたが、Pfu DNAポリメラーゼIIにPfu DNAポリメラーゼIを添加することによりその添加量依存的に10kb断片の増幅効率が向上していることが確認された。

【0064】

(2) 鎖長の異なるDNA断片の増幅

鋳型として $\lambda$ -DNA、プライマー対としてプライマー $\lambda$ 1および $\lambda$ 3、プライマー $\lambda$ 1および $\lambda$ 4あるいはプライマー $\lambda$ 1および $\lambda$ 5のそれぞれを使用し、以下に示す組成の反応液を調製した：

10mMトリスー塩酸、pH9.2、75mM KCl、6mM MgCl<sub>2</sub>、



0.4 mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP、0.01% BSA、各1.25単位のPfu DNAポリメラーゼIおよびPfu DNAポリメラーゼII、500 pgの $\lambda$ -DNA、5 pmolずつの各プライマー、5 ngあるいは50 ngのフコース硫酸含有多糖-F（最終容量は25  $\mu$ l）。

## 【0065】

各反応液について98℃、0秒～68℃、0秒を1サイクルとした30サイクルの反応を行った。反応終了後、反応液5  $\mu$ lを1%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。その結果、使用したプライマー対に応じて1 kb、2 kb、4 kbのDNA断片が増幅されていることが確認された。フコース硫酸含有多糖-Fに関しては50 ngを添加したものの方が5 ngに比べて良好な増幅効率を示した。

## 【0066】

## 実施例6 従来のPCR技術との比較

## (1) 長鎖DNAの増幅

$\lambda$ -DNAを鋳型とした10～15 kbのDNA断片の増幅反応について、実施例5の(2)に記載の反応系と3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼと該活性を有しないDNAポリメラーゼとの組み合わせからなるLA-PCR法との比較を行なった。なお、LA-PCR反応液はTakara LA PCR キット Ver. 2（宝酒造社製）を用いて調製した。

## 【0067】

プライマー対としてプライマー $\lambda$ 1および $\lambda$ 8、プライマー $\lambda$ 1および $\lambda$ 9あるいはプライマー $\lambda$ 1および $\lambda$ 10のそれぞれを使用し、以下に示す組成の反応液を調製した：

10 mM トリス-塩酸、pH 9.2、75 mM KCl、6 mM MgCl<sub>2</sub>、0.4 mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP、0.01% BSA、各1.25単位のPfu DNAポリメラーゼIおよびPfu DNAポリメラーゼII、500 pgの $\lambda$ -DNA、5 pmolずつの各プライマー、50 ngのフコース硫酸含有多糖-F（最終容量は25  $\mu$ l）。

## 【0068】

また、上記反応液同様の鋳型DNA量、プライマー量としたLA-PCR反応液（最終容量は25 $\mu$ l）を上記のTaKaRa LA PCR キット Ver. 2を用いて調製した。

【0069】

これらの反応液について98℃、0秒～68℃、3分を1サイクルとした25サイクルの反応を行った後、反応液5 $\mu$ lを1%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。その結果、実施例5の（2）に記載のPfu DNAポリメラーゼIおよびPfu DNAポリメラーゼIIの組み合わせでは、各プライマー対に対してそれぞれ10kb、12kbおよび15kbのDNA断片の増幅が確認された。

【0070】

一方、従来のLA-PCRを使用した反応では10kb断片の増幅は確認されたが、12kbおよび15kbの断片の増幅は認められなかった。

【0071】

なお、1サイクルの条件を98℃、0秒～68℃、5分に変更して12kb断片の増幅を試みたところ、この場合にはLA-PCR反応液においても増幅が認められた。

【0072】

（2）短鎖DNAの短時間反応による増幅

$\lambda$ -DNAを鋳型とした0.5～4kbのDNA断片の増幅反応について、実施例5の（2）に記載の反応系とLA-PCR法、ならびにDNA合成速度が高いことが知られているKOD DNAポリメラーゼの比較を行なった。なお、LA-PCR反応液は上記のTaKaRa LA PCR キット Ver. 2を用いて、また、KOD DNAポリメラーゼ反応液は東洋紡社製のKOD DNAポリメラーゼと添付の反应用緩衝液を用いてそれぞれ調製した。

【0073】

プライマー対としてプライマー $\lambda$ 1および $\lambda$ 2、プライマー $\lambda$ 1および $\lambda$ 3あるいはプライマー $\lambda$ 1および $\lambda$ 5のそれぞれを使用し、以下に示す組成の反応液を調製した：

10 mM トリスー塩酸、pH 9.2、75 mM KCl、6 mM  $MgCl_2$ 、0.4 mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP、0.01% BSA、各 1.25 単位の Pfu DNA ポリメラーゼ I および Pfu DNA ポリメラーゼ II、500 pg の  $\lambda$ -DNA、5 pmol ずつの各プライマー、50 ng のフコース硫酸含有多糖-F（最終容量は 25  $\mu$ l）。

【0074】

また、上記反応液同様のプライマー対を用いた LA-PCR 反応液、KOD DNA ポリメラーゼ反応液（ともに最終容量は 25  $\mu$ l）を調製した。ただし、この 2 種の反応液については鋳型である  $\lambda$ -DNA を 2500 pg ずつ加えた。

【0075】

これらの各反応液について 98℃、0 秒～68℃、0 秒を 1 サイクルとした 25 サイクルの反応を行った後、反応液 5  $\mu$ l を 1% アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。その結果、Pfu DNA ポリメラーゼ I および Pfu DNA ポリメラーゼ II の組み合わせでは、各プライマー対に対してそれぞれ 0.5 kb、1 kb および 4 kb の DNA 断片の増幅が確認された。

【0076】

これに対して、従来の LA-PCR 反応液、KOD DNA ポリメラーゼ反応液では、5 倍量の鋳型 DNA を含むにもかかわらず 0.5 kb の DNA 断片のみが微弱に増幅されているのが認められたに過ぎなかった。

【0077】

(3) DNA 検出感度の比較

微量の  $\lambda$ -DNA を鋳型とした DNA 断片の増幅反応について、実施例 5 の (2) に記載の反応系と LA-PCR 法の比較を行なった。なお、LA-PCR 反応液は上記の TaKaRa LA PCR キット Ver. 2 を用いて調製した。

【0078】

プライマー対としてプライマー  $\lambda$ 1 および  $\lambda$ 2 を使用し、以下に示す組成の反応液を調製した：

10 mM トリスー塩酸、pH 9.2、75 mM KCl、6 mM  $MgCl_2$ 、

0.4 mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP、0.01% BSA、各1.25単位のPfu DNAポリメラーゼIおよびPfu DNAポリメラーゼII、0.05fgのλ-DNA、5pmolずつの各プライマー、50ngのフコース硫酸含有多糖-F（最終容量は25μl）。

【0079】

また、上記反応液同様の鑄型DNA量、プライマー量のLA-PCR反応液を調製した。

【0080】

この両反応液について98℃、0秒～68℃、0秒を1サイクルとした50サイクルの反応を行った後、反応液5μlを1%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。その結果、実施例5の（2）記載の反応系でのみ0.5kbのDNA断片の増幅が認められた。

【0081】

次に、プライマー対をプライマーλ1およびλ8に変更し、上記同様に2種の反応液を調製した。両反応液について98℃、0秒～68℃、3分を1サイクルとした50サイクルの反応を行った後、反応液5μlを1%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。その結果、実施例5の（2）記載の反応系では10kbのDNA断片の増幅が認められたのに対し、従来のLA-PCR反応液ではDNA断片の増幅は認められなかった。

【0082】

【発明の効果】

本発明により、DNAポリメラーゼの有するDNA合成活性を促進するDNAポリメラーゼ活性促進剤が提供される。該促進剤は各種のDNAポリメラーゼに対して作用を示し、その活性を促進する。また、本発明は高効率でのDNA合成を可能とするDNA合成反応用組成物を提供する。上記の促進剤ならびに組成物はDNAポリメラーゼが使用される各種の工程、たとえばPCR法等に利用することができ、遺伝子工学研究用試薬として有用である。また、本発明によれば、多くのサンプルを取り扱う、PCR法に基づく遺伝子診断法等に使用することによって、遺伝子診断法等をより短時間に行なうことができるという優れた効果を

奏する。

【0083】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GATGAGTTCG TGTCCGTACA ACT

23

【0084】

配列番号：2

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

ACAAAGCCAG CCGGAATATC TG

22

【0085】

配列番号：3

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GATGAGTTCG TGTCCGTACA ACTGGCGTAA TCATG

35

【0086】

配列番号：4

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GGTTATCGAA ATCAGCCACA GCGCC

25

【0087】

配列番号：5

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GCGTACCTTT GTCTACGGG CAA

23

【0088】

配列番号：6

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GATAGCTGTC GTCATAGGAC TC

22

【0089】

配列番号：7

配列の長さ：2 3

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CTTAACCAGT GCGCTGAGTG ACT

23

【0 0 9 0】

配列番号：8

配列の長さ：2 8

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

TTGCCACTTC CGTCAACCAG GCTTATCA

28

【0 0 9 1】

配列番号：9

配列の長さ：2 9

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

TGTCCGTCAG CTCATAACGG TACTTCACG

29

【0 0 9 2】

配列番号：1 0

配列の長さ：2 8

配列の型：核酸

特平 10-114005

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

ATATCTGGCG GTGCAATATC GGTACTGT

28



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

本発明は遺伝子工学分野において有用なDNAの合成方法、ならびに該方法に使用される組成物を提供すること。

【解決手段】

酸性高分子物質を含有してなるDNAポリメラーゼ活性促進剤、DNA合成反応を行なうに際し、該DNAポリメラーゼ活性促進剤の存在下に反応を行なうことを特徴とするDNA合成方法、該DNAポリメラーゼ活性促進剤を含有するDNA合成反応用組成物、DNA合成反応を行なうに際し、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを使用することを特徴とするDNA合成方法。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 591038141

【住所又は居所】 京都府京都市伏見区竹中町609番地

【氏名又は名称】 寶酒造株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100095832

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区谷町2丁目8番1号 大手前M  
2ビル5階 細田国際特許事務所

【氏名又は名称】 細田 芳徳

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591038141]

1. 変更年月日 1991年 2月 4日

[変更理由] 新規登録

住 所 京都府京都市伏見区竹中町609番地

氏 名 寶酒造株式会社

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**